

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program:

Speciální chemicko-biologické obory

Studijní obor:

Molekulární biologie a biochemie organismů



Robert Rädisch

Intracelulární život patogenní bakterie *Francisella tularensis* v hostiteli.

Intracellular life of pathogenic bacterium *Francisella tularensis* in the host.

Bakalářská práce

Školitel: doc. RNDr. Ivo Konopásek, CSc.

Praha, 2014

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 14. 8. 2014

Podpis

Velmi děkuji svému školiteli doc. RNDr. Ivu Konopáskovi, CSc. za rady a připomínky při vypracování této bakalářské práce. Také děkuji svým rodičům za jejich podporu při studiu.

Abstrakt

Francisella tularensis je fakultativně intracelulární patogenní bakterie, která způsobuje u hostitele onemocnění nazvané tularémie. Pro vstup do hostitelské buňky využívá *Francisella* hostitelské buněčné mechanismy, kterými je inkorporována do buněčného fagozomu. Z fagozomu následně uniká do cytosolu, kde probíhá bakteriální pomnožení. Některé pomnožené bakterie jsou odstraňovány autofagií, z jiných se uvolňuje dsDNA, která je rozeznána cytosolickými senzory, které vytvoří inflamazomový komplex. Inflamazom spouští dráhu vedoucí k smrti napadené buňky. *Francisella* již od průniku do buňky ovlivňuje buněčnou signalizaci ve svůj prospěch tak, aby si zajistila dostatečný čas a dostatek potřebných živin pro své pomnožení. *Francisella* nepůsobí jen v napadené buňce, kde omezuje své rozeznání a odstranění z cytosolu, ale také indukuje sekreci faktorů z buňky, které utlumí aktivaci adaptivní imunity hostitele.

Klíčová slova:

Francisella, tularémie, fagozom, inflamazom, autofagie, adaptivní imunita

Abstract

Francisella tularensis is a facultative intracellular pathogenic bacterium, which causes disease named tularemia. For the entrance to the host cells *Francisella* uses host's cell mechanisms by which it is incorporated into cell phagosome. Subsequently, it escapes from phagosome to cytosol where bacterial growth takes place. Some of bacteria are cleared from cytosol by autophagy, from another ones dsDNA is released. This DNA is recognized by cytosolic receptors, which form inflammasome complex. Inflammasome sets off pathway leading to the death of infected cell. Since the penetration to the cell *Francisella* modulates cell signalling in its own benefit to ensure enough time and nutrients for its growth. *Francisella* do not act only in the infected cells, where it reduces recognition of itself and clearance from cytosol, but it also induces secretion of factors, which moderate activation of adaptive immunity of the host.

Key words:

Francisella, tularemia, phagosome, inflammasome, autophagy, adaptive immunity

Seznam zkratek

| | | |
|----------------|--|---|
| AIM2 | Absent In Melanoma 2 | nepřítomný v melanomu 2 |
| APC | Antigen Presenting Cells | antigen prezentující buňky |
| ATG | Autophagy related Gene | geny podílející se na procesu autofagie |
| BMMs | Bone Marrow-Derived Macrophages | makrofágy vzniklé z kostní dřeně |
| CR | Complement Receptor | Komplementové receptory |
| DAMPs | Damage Associated Molecular Patterns | molekulární struktury asociované s poškozením |
| dip | Deficient in Intracellular Proliferation | defektní při vnitrobuněčném množení |
| DISC | Death Inducing Signal Complex | smrt spouštějící signální komplex |
| dsDNA | double strand DNA | dvouvláknová DNA |
| FCP | <i>Francisella</i> Containg Phagosome | fagozom obsahující <i>Francisella</i> |
| FCV | <i>Francisella</i> Containg Vacuole | vakuola obsahující <i>Francisella</i> |
| FPI | <i>Francisella</i> Pathogenic Island | ostrov patogenity <i>Francisella</i> |
| IFNGR | IFN Gama Receptor | receptor pro IFN gama |
| IL | Interleukin | interleukin |
| IFN | Interferon | interferon |
| LAMP | Lysosome Associated Membrane Protein | membránový protein asociovaný s lysozomy |
| LVS | Live Vaccine Strain | živý vakcínový kmen |
| MDM | Monocyte Derived Macrophage | makrofágy vzniklé z monocytů |
| MHC | Major Histocompatibility Complex | hlavní histokompatibilní komplex |
| NF- κ B | Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of activated B cells | jaderný faktor kappa z aktivovaných B buněk |
| NOD | Nucleotide Oligomerization Domain | doména oligomerizující nukleotidy |
| PAMPs | Pathogen Associated Molecular Patterns | molekulární struktury asociované s patogeny |
| pdp | Pathogenicity Determinant Protein | patogenitu určující protein |
| PGE2 | Prostaglandin E2 | prostaglandin E2 |
| PKCa | Protein Kinase C α | proteinová kináza C α |
| PKCb | Protein Kinase C β | proteinová kináza C β |
| PRRs | Pathogen Recognition Receptors | patogen rozeznávající receptory |
| TLR | Toll like receptor | receptor rozeznávající cizí struktury |
| TNF | Tumor Necrosis Factor | faktor nekrotizující nádory |

Obsah:

| | |
|---|--------|
| 1. Úvod | - 1 - |
| 2. <i>Francisella tularensis</i> | - 2 - |
| 2.1. Patogeneze | - 3 - |
| 2.2. Vstup do buňky..... | - 3 - |
| 2.2.1. Fagocytóza | - 4 - |
| 2.2.2. Klatrinem zprostředkovaná endocytóza..... | - 4 - |
| 2.2.3. Vstup do fagocytující buňky | - 5 - |
| 2.2.4. Vstup do nefagocytující buňky | - 7 - |
| 3. Intracelulární život bakterie v hostitelské buňce | - 8 - |
| 3.1. Fagozom | - 8 - |
| 3.2. Únik z fagozomu | - 10 - |
| 3.3. Ostrov patogenity <i>Francisella</i> | - 11 - |
| 3.4. Signalizace | - 13 - |
| 3.4.1. Interferony a NF-κB | - 15 - |
| 4. <i>Francisella</i> a její modifikace imunitní odpovědi hostitele | - 16 - |
| 4.1. Buněčná smrt..... | - 16 - |
| 4.1.1. Apoptóza | - 17 - |
| 4.1.2. Nekróza..... | - 17 - |
| 4.1.3. Pyroptóza..... | - 18 - |
| 4.2. Modulace drah buněčné smrti | - 18 - |
| 4.3. Neadaptivní imunita | - 19 - |
| 4.3.1. Autofagie | - 19 - |
| 4.3.2. Inflamazom..... | - 20 - |
| 4.4. Adaptivní imunita | - 21 - |
| 4.4.1. Modifikace adaptivní imunity..... | - 22 - |
| 5. Závěr | - 26 - |
| Seznam použité literatury | - 27 - |

1. Úvod

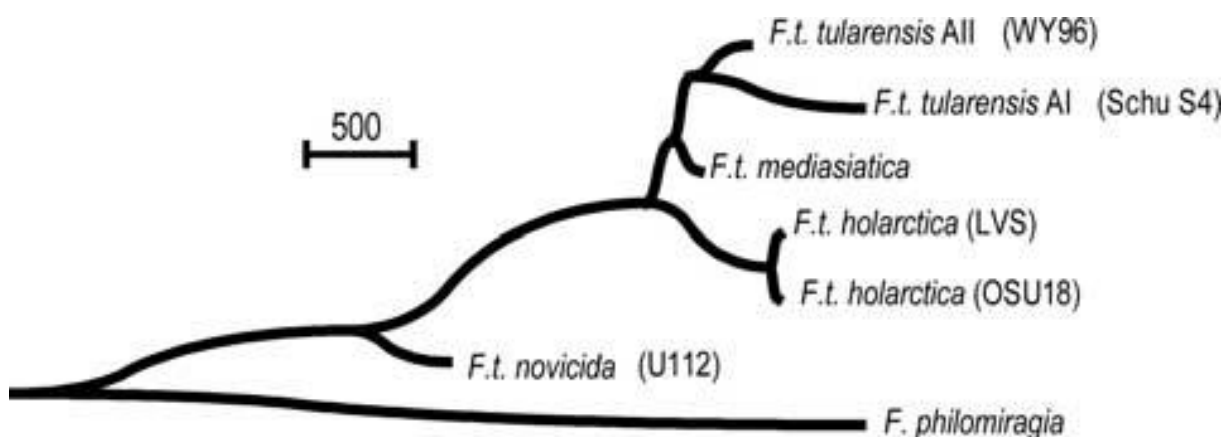
Tato bakalářská práce si klade za cíl přiblížit čtenáři pozoruhodnou bakterii *Francisella tularensis* a její interakci s hostitelskou buňkou. V této práci budou čtenáři poskytnuty základní informace, které jsou v současnosti známy o *Francisella tularensis* a jejím životním cyklu, nemoci, kterou způsobuje, a mechanismech, které využívá.

Francisella je intracelulární patogenní bakterie, která proniká do hostitelské buňky, kde probíhá její pomnožení. Stejně jako ostatní intracelulární bakterie využívá hostitelské živiny, které jsou v buňce ve větším množství než v extracelulárním prostoru. Další výhodou intracelulárního životního stylu je, že se takto vyhýbá působení složek imunitního systému, například komplementu. Bakterie žijící intracelulárně v hostitelských buňkách využívají mnoha mechanismů, které jim umožní přežít či se vyhnout působení neadaptivního imunitního systému uvnitř buněk (FLANNAGAN et al., 2009). *Francisella*, která vstoupí do hostitelské buňky, se nachází ve fagozomu, který je součástí imunitního systému, a proto se brání jeho působení tak, že blokuje jeho mechanismy působení, a následně uniká z fagozomu do cytosolu. V cytosolu dochází k bakteriálnímu pomnožení, ale také zde dochází k interakci bakterie se složkami imunitního systému. Dochází k vytvoření proteinového komplexu inflamazomu, který nasměruje buňku k programované buněčné smrti, nebo zahájení autofagie bakterií uvnitř buňky. Oba tyto mechanismy mají za cíl omezit šíření bakteriální infekce v buňce a v celém hostitelském organismu, ale *Francisella* ovlivňuje tyto obranné mechanismy ve svůj prospěch tak, aby měla dostatek času pro své pomnožení. Po dostatečném pomnožení bakterií uvnitř napadených buněk tyto buňky podléhají buněčné smrti, čímž je dána patogenita *Francisella*. Smrt hostitelských buněk hraje v životě *Francisella* důležitou roli, protože se tak nově namnožené bakterie dostávají z intracelulárního prostředí zpátky do extracelulárního a mohou se tak dále rozšířit po hostitelském organismu. Masivní poškození napadených tkání vede k selhání organismu a smrti jedince. *Francisella tularensis* způsobuje onemocnění, které se jmenuje tularémie. Pro tularémii je charakteristická vysoká úmrtnost, protože k pomnožení bakterií dochází v životně důležitých orgánech hostitele, jako jsou játra a plíce. Bakterie *Francisella tularensis* je považována za potencionální biologickou zbraň z důvodů její snadné přenositelnosti a vysoké úmrtnosti, která dosahuje až 30% při nenasazení léčby.

2. *Francisella tularensis*

Fakultativní intracelulární gramnegativní bakterie *Francisella tularensis* je vysoce virulentním mikroorganismem, protože vdechnutí pouhých 10 bakterií stačí k tomu, aby propuklo onemocnění – tularémie. *Francisella tularensis* je schopna infikovat mnoho savčích druhů. V přírodě se jedná především o zajíce, králíky a hlodavce. Jako přenašeči slouží klíšťata a komáři, kteří sají na nakažených živočiších. Zajišťují tak životní cyklus *Francisella tularensis* a umožňují tak šíření bakteriální infekce dále. Onemocnění má 3 formy, které se odvíjejí od způsobu infekce, zevní, vnitřní a generalizovanou. Z hlediska bioterorismu je *Francisella tularensis* klasifikována jako patogen kategorie A, protože je snadno přenositelná, efektivní a infekce způsobuje vysokou úmrtnost. Je tedy potenciálně využitelná k teroristickým útokům (ELLIS et al., 2002).

Existují 4 podruhy (Obr. 1) *Francisella tularensis*: *tularensis*, *holarctica*, *mediasiatica* a *novicida* (BROEKHUIJSEN et al., 2003). Nejvirulentnější je poddruh *tularensis*, který způsobuje smrtelné onemocnění u lidí, je označován jako typ A a dle klasifikace pro patogenní bakterie se řadí do kategorie 3. Jako typ B je označován poddruh *holarctica*, který spolu s poddruhem *mediasiatica* vyvolává mírnější onemocnění, které nezpůsobuje tak vysokou úmrtnost a patří do kategorie 2 (KEIM et al., 2007). Poslední poddruh *novicida* je některými autory považován jako samostatný druh, ale dle 16S RNA se jedná o poddruh *Francisella tularensis* (FORSMAN et al., 1994). *Francisella tularensis novicida* nezpůsobuje onemocnění u lidí, ale například u myši. Jako modelový organismus se používá atenuovaná *Francisella tularensis holarctica* LVS (Live Vaccine Strain) a také *Francisella tularensis novicida* (KEIM et al., 2007).



Obr. 1: **Fylogenetický strom rodu *Francisella*.** Převzato z KEIM et al. (2007).

2.1. Patogeneze

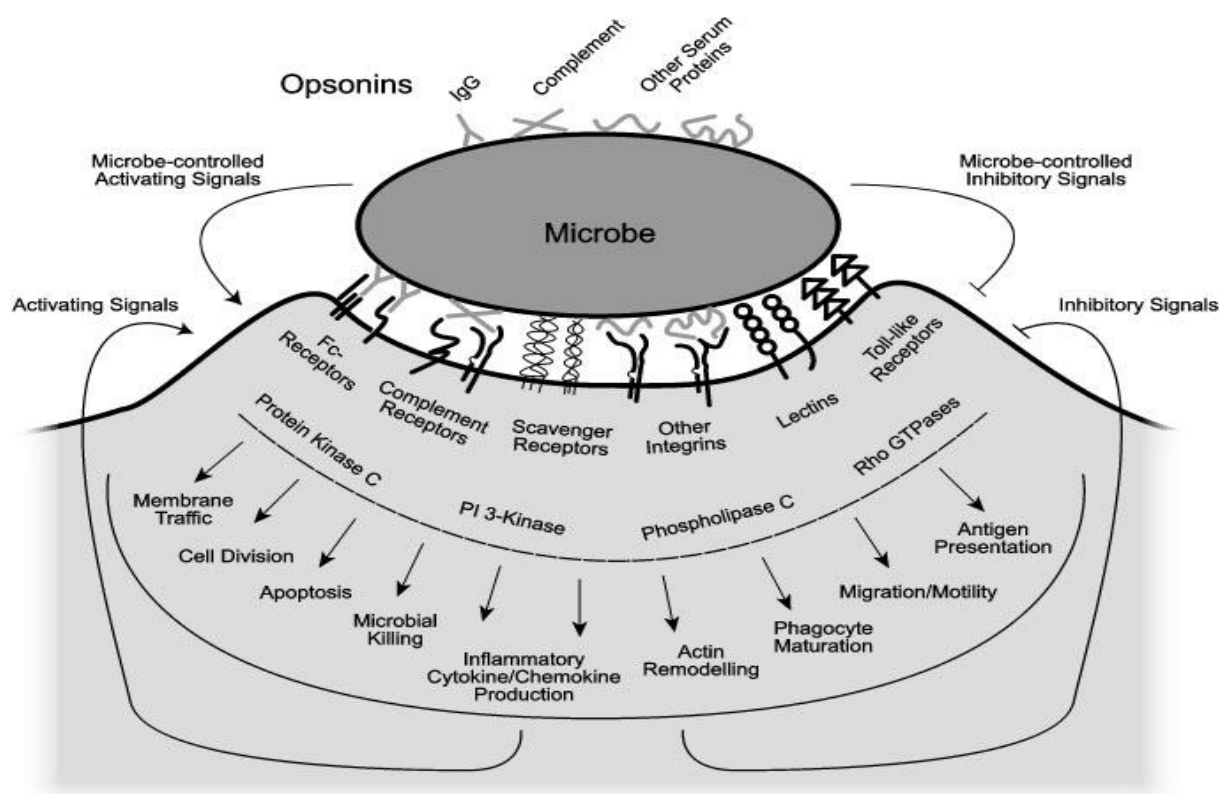
Francisella tularensis způsobuje tularémii, onemocnění podobné moru u řady živočišných druhů především pak u hlodavců. Pro tularémii je charakteristická vysoká teplota a celková slabost organismu. Inkubační doba je 2 až 5 dní, ale může být i delší, záleží to na způsobu nakažení. Člověk se může nakazit přímým kontaktem s postiženým zvířetem nebo kousnutím hmyzím vektorem (klíště, komár). Patogen proniká do hostitele buď v místech povrchových zranění pokožky, nebo přes sliznice. Na kůži v místech průniku do organismu vznikají vředovité léze, ze kterých se bakterie šíří lymfatickým systémem a krevním řečištěm do retikuloendoteliálních orgánů (játra, slezina), kde se často vytváří granuloma, což jsou shluky buněk imunitního systému, která mají zabránit šíření bakterií. Při infekci přes sliznice stačí vdechnutí pouhých 10 bakterií k vyvolání onemocnění. V hostiteli dochází k pomnožení bakterií *Francisella* v makrofázích, hepatocytech a endoteliálních buňkách. Nejdůležitější pro *Francisella* a její zdárnou patogenezi je infekce makrofágů. Makrofágy jako antigen prezentující buňky jsou schopny aktivovat adaptivní imunitní odpověď, která vede k odstranění *Francisella* z hostitele. Aby k tomu nedošlo, využívá *Francisella* mnoho mechanismů, kterými zabrání této aktivaci. V diagnostice infekce *Francisella tularensis* se dá použít čokoládový agar, na kterém je *Francisella* schopná růstu, ale protože je vysoké riziko nakažení laboratorního personálu, tak se diagnostikuje *Francisella* převážně pomocí serologických testů. K léčbě se používá streptomycin nebo gentamycin, které lze použít ve všech formách infekce. Při nepodání antibiotik dosahuje úmrtnost hodnot okolo 30% (BENEŠ, 2009; KENNETH, 2010).

2.2. Vstup do buňky

Ke svému vstupu do buňky bakterie využívají receptorem zprostředkovanou endocytózu, kterou zajišťuje hostitelská buňka. Mechanismus vstupu se liší u buněk schopných fagocytózy, jako jsou makrofágy, neutrofily a dendritické buňky, což jsou buňky imunitního systému a ostatních buněk – hepatocyty, endoteliální buňky aj..

2.2.1. Fagocytóza

Fagocytóza je obranný mechanismus neadaptivní imunity, jehož cílem je pohlcení cizorodé částice a její degradace uvnitř buňky. Na rozeznání mikroorganismu se podílí mnoho receptorů, jako jsou Fc-receptory, komplementové receptory, úklidové (scavenger) receptory, lektiny, integriny a Toll-like receptory (TLR) (Obr. 2). Aktivace těchto receptorů spouští signální kaskády vedoucí k přeuspořádání aktinového cytoskeletu. Dochází k tvorbě paožek, které obalí částici plasmatickou membránou a tím dojde k pohlcení částice a vytvoření fagozomu.



Obr. 2: Rozeznání mikroorganismu

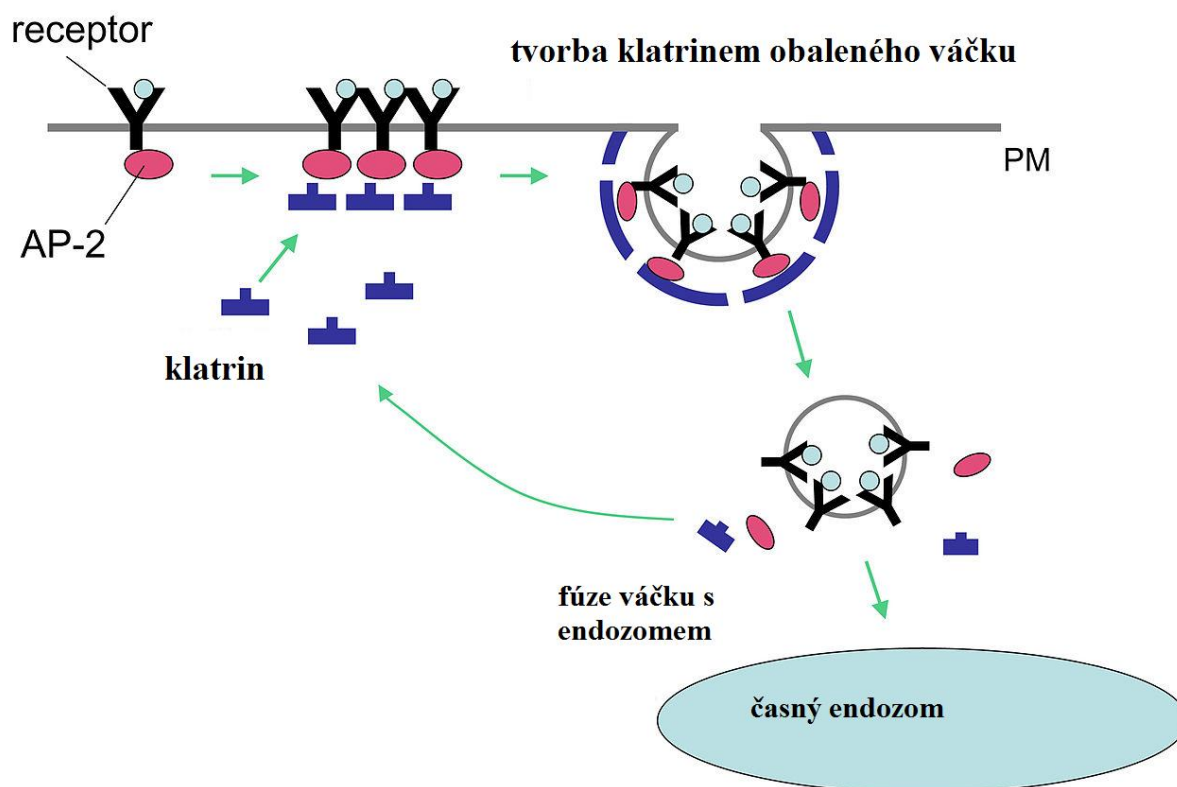
Mikrob je současně rozeznáván několika receptory, které spouštějí intracelulární signalizaci vedoucí k fagocytóze. Převzato z UNDERHILL et al. (2002).

2.2.2. Klatrinem zprostředkovaná endocytóza

Endocytóza je mechanismus, kterým je transportován materiál z okolí dovnitř buňky (Obr. 3). Na receptor v plasmatické membráně se naváže specifický náklad, což umožní navázání adaptorových proteinů uvnitř buňky, které vážou klatrin. Vazba klatrinu umožní vytvoření váčku, který následně v buňce fúzuje s endozomem. Endocytóza různých nákladů využívá široké spektrum adaptorových a doplňkových proteinů. Adaptorové a doplňkové proteiny

koordinují nukleaci klatrinového obalu v místech plazmatické membrány, ze kterých je následně odštěpený váček.

Klatrinem zprostředkovaná endocytóza

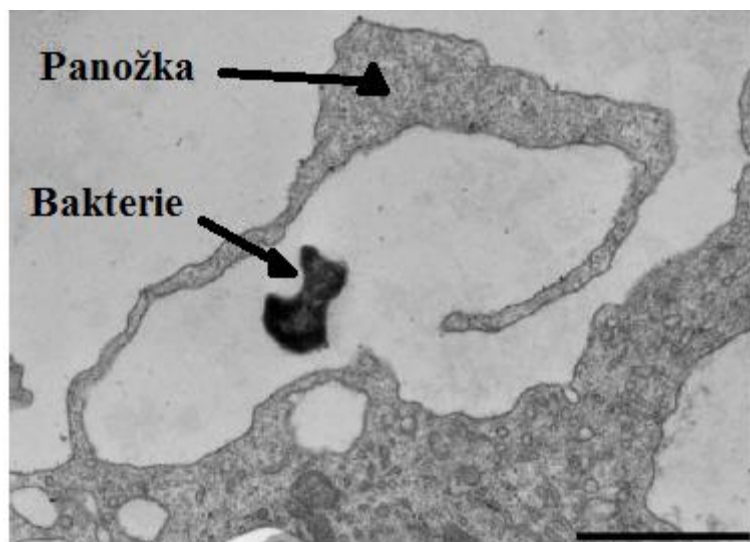


Obr. 3: Schématická endocytóza klatrinem. Převzato z ALBERTS et al. (2002).

Po dokončení endocytózy vzniká váček (časný endozom, fagozom), který má pH kolem 6,5, a tento váček je transportován po mikrotubulech ke středu buňky, kde dochází k jeho okyselení a vzniku pozdního endozomu. Pozdní endozom následně může fúzovat s lysozomem, který zajistí degradaci obsahu váčku. V lysozomu se nachází hydrolytické enzymy, které jsou aktivní při pH 5, jako jsou nukleázy, proteázy, glykosidázy, lipázy, fosfatázy a sulfatázy, fosfolipázy (ALBERTS et al., 2002).

2.2.3. Vstup do fagocytující buňky

Francisella tularensis vstupuje do lidských makrofágů fagocytóze podobným mechanismem zahrnujícím tvorbu zvláštních membránových struktur (Obr. 4) – „pseudopod loops“.

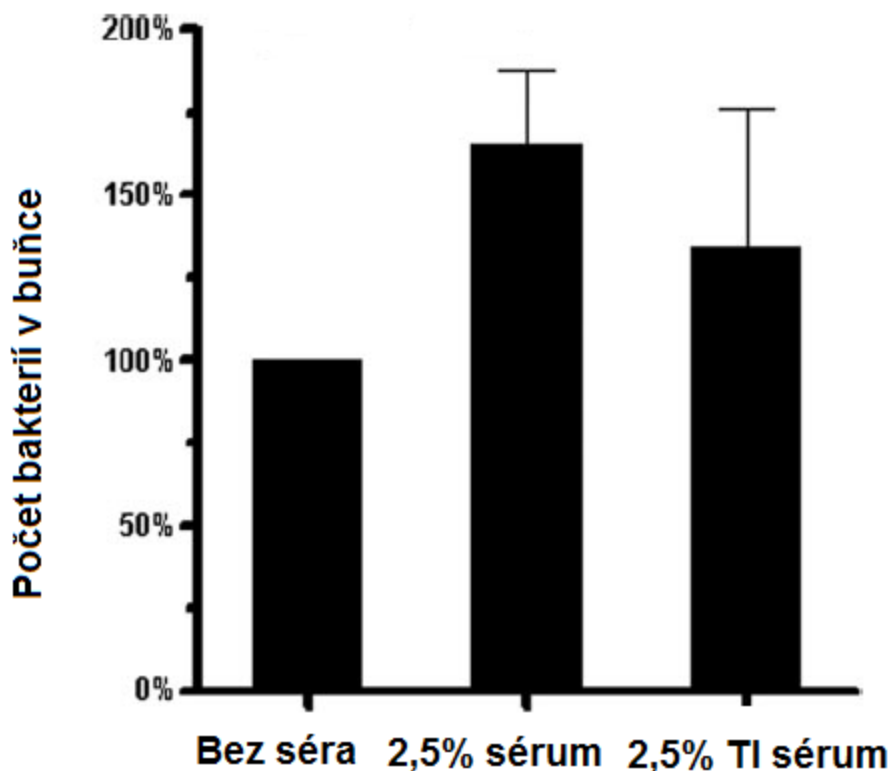


Obr. 4: Pohlcení bakterie makrofágem

Bakterie je obklopená panožkami a následně vnořena do makrofágu. Převzato z CLEMENS et al. (2005).

Tyto panožky vytvoří kolem bakterie prostorný váček, který je makrofágem pohlcen a během několika minut dochází k zmenšení jeho velikosti tak, aby těsně obklopoval pohlcenou bakterii. Pro pohlcení bakterie je nezbytné zapojení aktinových mikrofilament, protože jejich inhibice cytochalasinem-B snižuje vstup bakterie do buňky a zvyšuje její adhezi na buněčnou stěnu makrofágů. Dále je pro úspěšnou internalizaci vyžadována opsonizace bakterie pomocí komplementového proteinu C3 a buněčné komplementové receptory CR3. Pohlcení bakterie zprostředkované komplementovým receptorem CR3 nevyvolává oxidativní vzplanutí a je tedy důležité pro patogenezi (CLEMENS et al., 2005). Dále využívá *Francisella* ke vstupu do myších makrofágů membránové lipidové rafty s vysokým obsahem cholesterolu. Lipidovými rafty bez cholesterolu vstupuje pouze minimální množství bakterií do makrofágů. Těmito rafty vstupuje do buňky mechanismem využívající caveolin-1. Vstup bakterie do buňky blokuje Cytochalasin D, který inhibuje aktinovou polymerizaci, a nocodazol, který inhibuje polymerizaci mikrotubulů. Bakterie, které vstoupily do makrofágů přes lipidový raft, který neobsahoval cholesterol, nevykazují žádný vnitrobuněčný růst. Cholesterol z lipidového raftu je tedy důležitý pro pomnožení bakterie v cytosolu hostitele (TAMILSELVAM et al., 2008).

Opsonizace bakterie čerstvým a tepelně inaktivovaným sérem zvyšuje vstup bakterií do buňky (Obr. 5), protože komplementové proteiny a protilátky zvyšují asociaci bakterií a buněk hostitele.



Obr. 5: Opsonizace bakterie

Bakterie byly opsonizovány pomocí séra a následně pohlcovány makrofágy. Počet bakterií v buňce je vyšší pokud byly bakterie opsonizovány pomocí 2,5% séra a to i tepelně inaktivovaného (TI). Převzato z BALAGOPAL et al. (2006).

Francisella je opsonizovaná komplementovým proteinem C3 a protilátkami, kdy tyto opsoniny rozeznávají receptory na povrchu hostitelských buněk, kdy CR3 je receptor pro komplementové proteiny a FcγR je receptor pro protilátky. Neopsonizované bakterie jsou rozeznávány pomocí mannózových receptorů MR (BALAGOPAL et al., 2006).

2.2.4. Vstup do nefagocytující buňky

Francisella novicida využívá pro vstup do nefagocytujících jaterních buněk klasickou klatrinem zprostředkovanou endocytózu závislou na cholesterolu. Pro efektivní internalizaci je potřebný hostitelský adaptorový protein AP-2 a doplňkový protein Eps15, který slouží jako lešení pro AP-2. Inhibice tvorby aktinových mikrofilament cytochalasinem-D stejně jako u fagocytujících buněk značně snižuje průnik bakterie do buňky. Pro efektivní internalizaci bakterie do buňky je důležitý pouze aktin, který se podílí na klatrinové endocytóze, protože inhibice polymerizace mikrotubulů nocodazolem významně nesnižovala internalizaci bakterií

jaterními buňkami. Kaveolin nehraje žádnou roli při vstupu *Francisella novicida* do jaterních buněk (LAW et al., 2011).

Francisella tularensis využívá ke svému šíření v hostiteli erytrocyty, do kterých proniká a nechává se krví roznést po celém organismu. V erytrocytech nedochází k efektivnímu pomnožení a bakterie se zde nachází ve skoro dormantním stavu. Erytrocyty jakožto dlouho žijící buňky tak mohou sloužit jako rezervoár *Francisella*, ze kterého se může bakterie znovu rozšířit po organismu. Ke svému vstupu do erytrocytu využívá komplementový protein C3b, který se váže na povrch bakterie, jež rozštěpí na neaktivní 3bi, který zůstane na povrchu bakterie. Komplementový receptor erytrocytů a C3bi spolu interagují a usnadňují endocytózu, ale samostatně ji nejsou schopni zprostředkovat, protože erytrocyty jsou defektní v receptorem zprostředkované endocytóze, a proto mechanismus vstupu *Francisella* do erytrocytů zůstává nejasný (HORZEMPA et al., 2011).

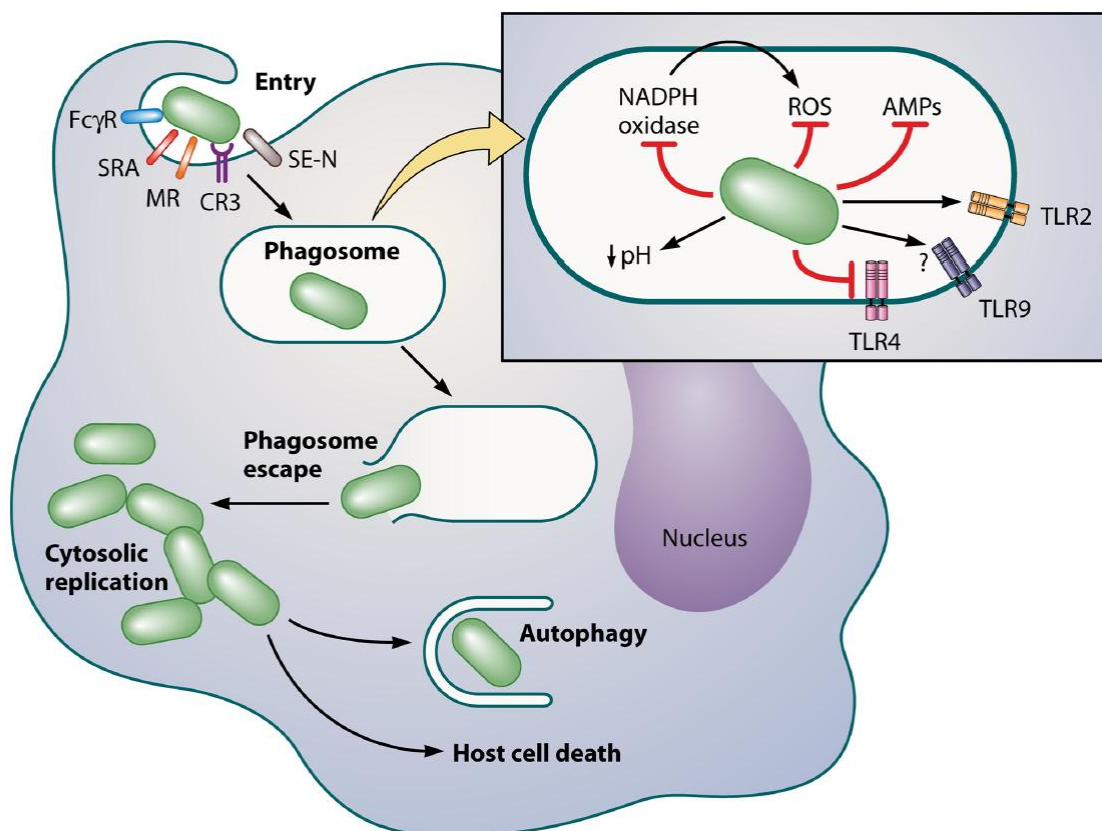
3. Intracelulární život bakterie v hostitelské buňce

Po vstupu do buňky se *Francisella* nachází v nehostinném fagozomu, ze kterého uniká do cytosolu. V cytosolu probíhá nejdůležitější část života bakterie, dochází zde k pomnožení bakterie. I zde ale *Francisella* musí čelit různým nástrahám neadaptivního imunitního systému jako je například autofagie. Životní cyklus intracelulární bakterie *Francisella tularensis* se dá tedy rozdělit do 3 fází – únik z fagozomu, pomnožení v cytosolu a modifikace neadaptivního/adaptivního imunitního systému.

3.1. Fagozom

Pohlčená bakterie se nachází v membránou obaleném váčku nazývajícím se FCP (*Francisella* Containing Phagosome). Za normálních podmínek fagozom fúzuje s lysozomy a vzniká fagolysosom, který má pohlčenou bakterii usmrtit. Únik z FCP je tedy nezbytným krokem v přežití *Francisella tularensis* v hostiteli (RAY et al., 2009). Únik bakterie z fagozomu se odvíjí od samotného vstupu bakterie do buňky, který tak ovlivňuje její intracelulární osud (Obr. 6) – záleží na tom, zda byla bakterie endocytována opsonizovaná či neopsonizovaná. Opsonizace komplementovými proteiny C3 či protilátkami IgG zvyšuje fagocytózu, ale zároveň omezuje únik bakterie z fagozomu a následné pomnožení v cytosolu. Fagocytóza opsonizovaného kmene *Francisella* *Schu S4* je zprostředkována receptorem CR3, SRA a FcγR, kdežto

neopsonizované bakterie jsou fagocytovány prostřednictvím manózových receptorů MR. Fagocytóza zprostředkovaná receptorem pro komplementový protein C3 opoždí dozrávání časných FCP a omezuje únik z fagozomu. Fagocytóza zprostředkovaná FcγR, což je receptor rozeznávající Fc část protilátky, je spojena s oxidativním vzplanutím, které má za následek také omezení úniku z fagozomu a omezení pomnožení bakterie v cytosolu, protože dochází k likvidaci části bakterií (GEIER et al., 2011).



Obr. 6: Fáze patogeneze *Francisella* v makrofágu

Francisella je rozeznávána mnoha receptory (Fcγ, SRA, MRA, CR3,...) a následně pohlčena za vzniku fagozomu. Ve fagozomu čelí bakterie obranným mechanismům hostitele jako je snižující se pH a kyslíkové radikály případně antimikrobiální peptidy. *Francisella* není ve fagozomu rozeznávána receptorem TLR4, ale aktivuje signalizaci receptoru TLR2. Po úniku z fagozomu dochází k cytosolickému pomnožení. Pomnožení bakterií vede buď k buněčné smrti anebo zahájení autofagie bakterií. Převzato z Jones et al. (2012).

Ve fagozomu bakterie čelí kyslíkovým radikálům ROS, které jsou produkovány NADPH oxidázou, což je membránově vázaný enzymový komplex, který přeměňuje molekulární kyslík na toxický superoxidový aniont. NADPH oxidáza je za normálních podmínek ve formě volných monomerů a její jednotlivé komponenty se nacházejí jak v cytosolu ($p47^{\text{phox}}$, $p40^{\text{phox}}$, $p67^{\text{phox}}$ a Rac2) tak vázané na plasmatické membráně ($gp91^{\text{phox}}$ a $p22^{\text{phox}}$). Cytosolické komponenty NADPH oxidázy se po fagocytóze dostávají do fagozomu, kde dochází ke složení

a vytvoření aktivního komplexu NADPH oxidázy, který vytváří ROS (NAUSEEF et al., 2004). Fosforylace komponent NADPH oxidázy je nezbytná k tomu, aby docházelo ke složení funkčního komplexu NADPH oxidázy na fagozomální membráně (MOHAPATRA et al., 2010).

Francisella používá několik způsobů obrany proti ROS, mezi které patří blokování složení komplexu NADPH oxidázy na fagozomální membráně, blokování produkce ROS u již složeného komplexu NADPH oxidázy a také zabraňuje působení ROS tak, že je odbourává pomocí enzymů na neškodné látky jako je voda nebo kyslík. *Francisella tularensis* kmene LVS zabraňuje oxidativnímu vzplanutí lidských neutrofilů, protože fagozom s LVS neobsahuje gp91/p22^{phox} nebo p47/p67^{phox} a tak nemůže dojít k vytvoření komplexu NADPH oxidázy (MCCAFFREY et al., 2006). U *Francisella novicida* existují 4 fosfatázy (AcpA, AcpB, AcpC, a Hap), které inhibují vytvoření komplexu NADPH oxidázy (MOHAPATRA et al., 2010). U lidských neutrofilů při infekci *Francisella tularensis* kmene *SchuS4* dochází taktéž ke snížení fosforylace phox proteinů, ale dále také dochází k vytvoření nefunkčních komplexů NADPH oxidáz na membráně fagozomu, které neprodukují ROS, protože aktivita oxidázy je inhibovaná bakteriálním regulačním faktorem fevR (MCCAFFREY et al., 2010). Na myším modelu gp91^{phox -/-}, který je defektní v syntéze NADPH oxidázy, bylo prokázáno, že NADPH oxidáza má pouze okrajovou roli v ochraně buňky před *Francisella tularensis*, protože aktivní NADPH oxidáza prodlužuje život infikovaných myší pouze o 1 den na průměrnou dobu přežití 6 dní od infekce (KUOLEE et al., 2011).

3.2. Únik z fagozomu

U většiny intracelulárních bakterií je v životním cyklu únik z fagozomu klíčový a dochází k němu u většiny patogenních bakterií během 30 minut po vstupu do buňky (RAY et al., 2009). Prostředí fagozomu se stává během svého dozrávání toxické pro většinu bakterií, protože v něm klesá pH a jsou do něj dále transportovány enzymy, které se účastní degradace pohlceného materiálu. FCP dozrává do stádia pozdního endozomu, během kterého dochází k okyselení fagozomu, což nastává během 15-30 minut po pohlcení *Francisella tularensis*. K okyselení dochází pomocí vakuolárních ATPázových pump, které transportují protony do FCP. *Francisella tularensis* uniká rychle z fagozomu do cytosolu lidských makrofágů mezi 30. a 60. minutou po infekci. Při použití inhibitoru ATPázových pump bafilomycinu A1 bylo zjištěno, že *Francisella tularensis* je stále schopná pronikat do

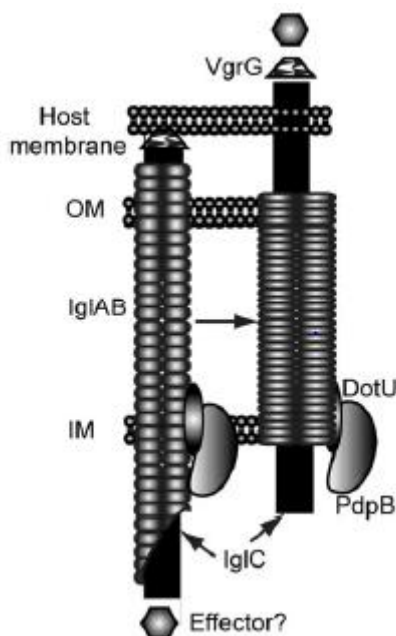
cytosolu makrofágů, ale se sníženou rychlostí, kdy 30-50 % bakterií proniklo do cytosolu během 6-12h po infekci. *Francisella* tedy pro rychlý průnik do cytosolu využívá obranný mechanismus hostitele, jakým je okyselení fagozomu ve svůj prospěch, ale dokáže se do cytosolu dostat i mechanismem nezávislým na pH (SANTIC et al., 2008).

Pro úspěšný únik z fagozomu jsou životně důležité geny, které se nacházející na ostrovu patogenity – *iglC* a *mgIA*. Protein IgIC a jeho regulátor MglA modifikují tvorbu fagozomu tak, aby nedokázal fúzovat s lysozomem, což poskytne bakterii prostor pro rozrušení membrány a její únik do cytoplasmy (SANTIC et al., 2005). Pro většinu bakterií je nezbytné uniknout z fagozomu do cytosolu, kde může dojít k jejich pomnožení. Doba, kterou bakterie stráví ve fagozomu, se odvíjí od způsobu vstupu bakterie do hostitelské buňky. Neopsonizovaná *Francisella* uniká během první hodiny, opsonizovaná uniká mezi 2. a 4. hodinou po vstupu bakterie do buňky (GOLOVLIOV et al., 2003). Mechanismus, jakým *Francisella* rozrušuje membránu fagozomu není v současné době znám, ale je možné, že je podobný tomu, který využívá *Listeria monocytogenes*. *Listeria* vyžaduje pro vstup do buňky cholesterol a následně sekretuje listeriolysin O, který se váže do membrány s cholesterolem, kde vytváří póry, které umožní lyzi fagozomu (Seveau et al., 2004; Gekara et al., 2004).

3.3. Ostrov patogenity *Francisella*

U *Francisella tularensis* se v genomu vyskytuje oblast zvaná ostrov patogenity – FPI (*Francisella* Pathogenic Island). Na tomto ostrově se nachází klastř 17 genů nezbytných pro růst bakterie uvnitř makrofágů a bakteriální virulenci. Jedná se o geny pro transportní systém a virulenční faktory. Gen *igl* (Intracellular Growth Locus) je důležitý pro vnitrobuněčný růst a gen *pdp* (Pathogenicity Determinant Protein) ovlivňuje patogenezi. *Francisella tularensis* obsahuje 2 kopie FPI a *Francisella novicida* pouze 1 kopii. Geny z FPI jsou vysoce konzervované u všech poddruhů *Francisella tularensis* krom jednoho genu *pdpD*, který se vyskytuje u typu A, ale nikoliv u typu B, a u *Francisella novicida*, kde má protein delší sekvenci (NANO et al., 2004). Protein PdpD je lokalizován na vnější membráně a podílí se na distribuci proteinů IgIA, IgIB a IgIC, které mají homologii s komponentami T6SS, v membráně. Protein PdpD má funkci ve virulenci, ale jeho činnost už neovlivňuje vnitrobuněčný růst (LUDU et al., 2008). Geny z ostrova patogenity u *Francisella tularensis* mají homologii se sekrečním systémem typu VI *Vibrio cholerae* a *Pseudomonas aeruginosa* (BARKER et al.,

2009). Pro *Francisella tularensis* byl navržený model sekrečního systému (Obr. 7), kterým jsou transportovány virulenční faktory z bakterie, která je ve fagozomu, do cytoplazmy hostitelské buňky (DE BRUIN et al., 2011).



Obr. 7: Sekreční systém typu VI ve 2 stavech

První stav (vlevo), kdy je vnější trubička relaxovaná a je tvořena proteinem IgIAB, která prochází vnější a vnitřní membránou bakterie, a uvnitř trubičky je polymer z IgIC. Druhý stav (vpravo), ke kterému dochází při kontrakci proteinu IgIAB, kdy vnitřní polymer z IgIC penetruje hostitelskou membránu v interakci s proteinem VgrG. Protein PdpB je stabilizován proteinem DotU na cytoplasmatické membráně bakterie. Převzato z DE BRUIN et al. (2011).

Tímto sekrečním systémem se sekretují proteiny IgIE, IgIC, VgrG, IgII, PdpE, PdpA, IgIJ a IgIF do cytosolu infikované buňky. Pro sekreci jsou nezbytné proteiny DotU, VgrG, IgIC a IgIG (BRÖMS et al., 2012). Protein DotU stabilizuje PdpB na cytoplasmatické membráně (DE BRUIN et al., 2011). Proteiny VgrG a IgII, které jsou sekretovány do cytosolu hostitelského makrofága, jsou nezbytné pro únik z fagozomu do cytosolu, intracelulární růst a virulenci *Francisella*. Sekrečním systémem, který je kódován na FPI, jsou sekretovány virulenční faktory, které jsou zodpovědné za modulaci imunitní odpovědi hostitelské buňky ve prospěch *Francisella tularensis* tak, aby se bakterie mohla pomnožit v cytosolu a způsobit onemocnění.

Pro modulaci spouštění drah, které vedou k buněčné smrti, jsou potřebné geny *pdpC*, *iglC*, *iglI*, a *iglG*. Gen *iglI* je důležitý pro fagozomální únik, protože kóduje protein, jehož funkcí je pravděpodobně destabilizace nebo degradace fagozomální membrány (LINDGREN et al., 2013). Po úniku do cytosolu se bakterie nachází v prostředí, kde se může pomnožit. Množí se bakterie je v cytosolu detekovaná cytosolickými senzory, které spouští výstavbu proteinového komplexu inflamazomu, který aktivuje dráhu vedoucí k buněčné smrti pyroptózou, což vede k vypuštění prozánětlivých IL-1 β (BARKER et al., 2009).

Francisella tularensis s mutací v *IglD* uniká z fagozomu lidských makrofágů do cytosolu rychleji než WT, ale je neschopná pomnožení se v makrofázích a plicních buňkách myši kmene BALB/c. Únik bakterie z fagozomu do cytosolu tedy není dostačující pro úspěšné pomnožení v cytosolu. Při koinfekci buňky bakteriemi s defektním genem *iglD* a WT dochází k pomnožení obou. Produkt genu *iglD* tedy modifikuje cytosolické prostředí tak, aby se v něm bakterie dokázaly pomnožit (SANTIC et al., 2007). Protein *IglC* je nutný pro fagozomální únik a zabránění fúze fagozomu s lysozomem (LINDGREN et al., 2004). Pro ovlivnění biogeneze fagozomu je esenciální gen *iglC* a jeho regulátor *MglA* (SANTIC et al., 2005). Transkripce genů z FPI je pod pozitivní kontrolou globálního regulátoru virulence *MglA*, který ovlivňuje expresi 7 genů (*pdpA*, *pdpD*, *iglA*, *iglC*, a *iglD*) (LAURIANO et al., 2004). *PdpE* a *IglG* jsou proteiny vnější membrány, které usnadňují únik z fagozomu. *Francisella novicida* s defektním genem *iglI*, oproti *LVS* se stejným defektem, vykazuje horší růst v cytosolu a také je lépe odstraňována imunitním systémem z cytosolu, protože má pouze jednu kopii genů z FPI. Bakterie kmene *LVS* s mutací v *iglG* a *iglI* nejsou schopné vyvolat efektivní cytopatogenní odpověď napadené buňky, která by vedla u napadené buňky k buněčné smrti (BROMS et al., 2011).

3.4. Signalizace

Po úspěšném úniku z fagozomu se *Francisella tularensis* nachází v cytosolu, ve kterém je hojnost živin, které bakterie využije při svém pomnožení. Během množení dochází k uvolňování různých komponent bakterií, některé lyzují. Tyto komponenty jsou rozeznávány cytosolickými senzory PRRs (Pathogen Recognition Receptors), které spouštějí různé signalizační kaskády (Obr. 8), kterými hostitelská buňka reaguje na rozeznání *Francisella tularensis* a spouští tak imunitní odpověď na infekci, která má vést k odstranění bakterie.

Francisella tularensis tedy musí modifikovat tyto signální kaskády ve svůj prospěch, aby byla schopná pomnožení.

Francisella po průniku do cytosolu indukuje produkci transkripčních faktorů sp1/sp3, které spouštějí expresi Fas. Interakce Fas s FasL indukuje složení DISC (Death Inducing Signal Complex) komplexu, který aktivuje kaspázu-8, která spouští kaskádu, která končí smrtí hostitelské buňky apoptózou. Fúze fagozomu s lysozomem je regulována buněčnými proteiny Akt a SHIP. Protein Akt podporuje fúzi fagozomu s lysozomem, kdežto inositolová fosfatáza SHIP brání fúzi fagozomu s lysozomem tím, že negativně reguluje aktivitu Akt. *Francisella tularensis* snižuje signalizaci PI3K/Akt, která by také vedla k započetí autofagie a prodlužuje si tak dobu po kterou se může v cytosolu pohodlně replikovat (BUTCHAR et al., 2008, RAJARAM et al., 2009). *Francisella novicida* dočasně aktivuje Ras 15 minut po infekci buňky, kdy je tato aktivace závislá na IgIC. Aktivace Ras je spuštěna nábohem proteinových kináz PKC α a PKC β do komplexu SOS2/GrB2. Aktivace Ras umožní bakteriální růst, protože nedojde k časně aktivaci kaspázy-3 během 8h po infekci (AL-KHODOR et al., 2010).

odstranění patogenů. Zvyšuje produkci NO, kyslíkových radikálů ROS, receptorů pro protilátky (FcγRI), receptorů pro komplement (CR3) a také zvyšuje produkci proteinových komplexů pro prezentaci antigenů (MHC I a II) na membráně. Pro transdukcí signálu je nutný membránový receptor IFNGR, kterým je přenášen signál. S IFNGR je asociovaná JAK kináza, která fosforyluje STAT1. STAT1 je transkripční faktor, který se po fosforylaci translokuje do jádra, kde ovlivňuje expresi genů. Signalizace IFN-γ je negativně regulovaná několika mechanismy, které zahrnují internalizaci IFNGR, defosforylaci JAK kináz a indukci proteinu SOCS, které potlačují cytokinovou signalizaci (STARK et al., 1998; SCHRODER, 2003).

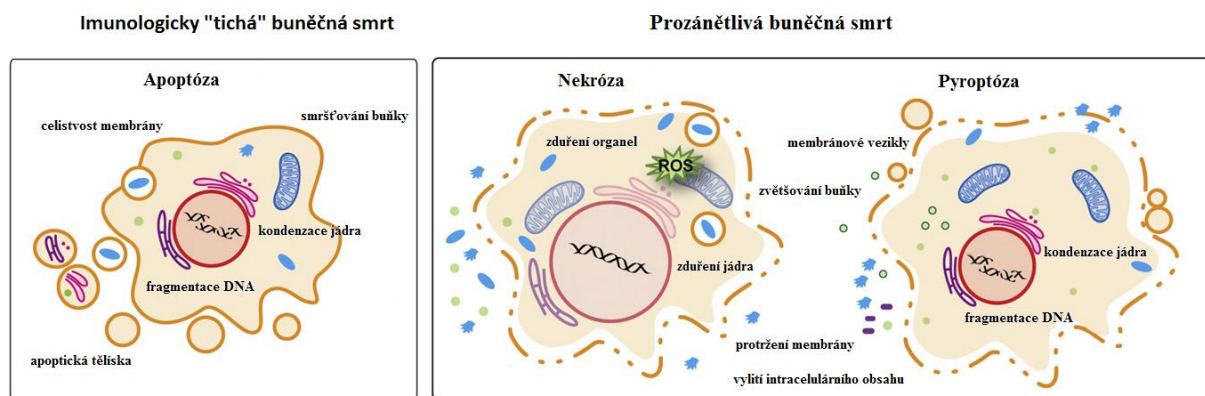
Transkripční faktor NF-κB má klíčovou roli v životě buňky, protože reguluje expresi řady genů, které mají svou funkci v řízení drah, které vedou k buněčné smrti apoptózou. V cytoplasmě se vyskytuje NF-κB v komplexu se svým inhibitorem IκB a do jádra se NF-κB translokuje až po fosforylaci IκB, která vede k degradaci inhibitoru. NF-κB zvyšuje odolnost buňky k buněčné smrti indukované TNF (BURSTEIN et al., 2003).

4. *Francisella* a její modifikace imunitní odpovědi hostitele

Imunitní mechanismy lze rozdělit do 2 základních kategorií: neadaptivní (nespecifické) a adaptivní (specifické). Obě kategorie zahrnují složky humorální, představované různými sérovými proteiny a nízkomolekulárními látkami, a buněčné, tvořené různými typy buněk.

4.1. Buněčná smrt

Buněčná smrt je jednou z odpovědí imunitního systému na virovou či bakteriální infekci. Programované buněčné smrti může být dosaženo 3 rozdílnými mechanismy, které vyústí ve smrt buňky apoptózou, nekrózou nebo pyroptózou (Obr. 9). Pozměnění dráhy buněčné smrti se zdá být nezbytným předpokladem pro úspěšný životní cyklus mnoha intracelulárních patogenů.



Obr. 9: Typy buněčné smrti

Imunologicky „tichá“ buněčná smrt je charakteristická zachováním celistvosti plasmatické membrány jako je tomu u apoptózy. Naproti tomu u nekrózy a pyroptózy dochází k vytlití buněčného obsahu do mezibuněčného prostoru, což vede k zánětu a poškození okolních buněk. Převzato z LAMKANFI et al. (2010).

4.1.1. Apoptóza

Apoptóza je typ programované buněčné smrti, který se podílí na udržování homeostáze u dospělého organismu tím, že jsou odstraňovány opotřebované buňky bez vyvolání zánětu. Pro apoptózu je charakteristické smršťování buňky, kondenzace chromozomů a jejich fragmentace, a tvorba apoptických tělísek, které jsou fagocytovány ostatními buňkami. Během apoptózy dochází ke zrušení potenciálu na mitochondriální membráně, aktivaci selektivních proteáz z rodiny kaspáz a nukleáz, které rozštěpí DNA a různé proteiny, a také k translokaci fosfatidylserinu do vnější vrstvy plasmatické membrány. Signalizace spouštějící apoptózu je vnitřní i vnější. Vnější signálem pro apoptózu je navázání TNF (Tumor Necrosis Factor), Fas ligandu FasL a proteinu TRAIL na transmembránové receptory. Jako vnitřní signály pro apoptózu slouží proteiny cytochrom c, SMAC/Diablo a HtrA2/Omi. Tyto signální molekuly se za normálních podmínek nacházejí uvnitř mitochondrií a při jejich poškození se vylévají do cytosolu a spouští kaskádu vedoucí k apoptóze (LAMKANFI et al., 2010).

4.1.2. Nekróza

K nekróze dochází, když selže aktivace kaspáz, jež by umožnily apoptickou smrt buňky. Nekróza je morfologický opak apoptózy, kdy dochází ke zvětšování buňky a následné lýzi, DNA je nekondenzovaná a hydrolyzovaná. Při lýzi buňky dochází k vypuštění prozánětlivých

signálů DAMPs (Damage-associated Molecular Patterns). DAMPs jsou struktury charakteristické pro poškozené buňky (LAMKANFI et al., 2010).

4.1.3. Pyroptóza

Pyroptóza sdílí některé znaky s apoptózou a nekrózou. Pro pyroptózu je charakteristické vypuštění prozánětlivých interleukinů IL-1 β a IL-18, tvorba pórů v plasmatické membráně, kondenzace jádra a fragmentace DNA. Tato buněčná smrt je závislá na aktivaci kaspázy-1, ke které dochází v inflamazomu. Inflamazom obsahuje NOD-like receptory, jež rozeznávají PAMPs v cytosolu. Aktivovaná kaspáza-1 štěpí prekursorů interleukinů pro-IL-1 β a pro-IL-18, aktivuje kaspázu-7 a další substráty, které jsou zodpovědné za permeabilizaci membrány. Sekrece IL-1 β a IL-18 dělá z pyroptózy prozánětlivou buněčnou smrt (LAMKANFI et al., 2010).

4.2. Modulace drah buněčné smrti

Francisella tularensis se dokáže masivně pomnožit uvnitř makrofágů, kdy pomnožení končí buněčnou smrtí napadených buněk. Infekce bakterií *Francisella tularensis* kmene LVS vede k indukci buněčné smrti, která je podobná apoptotické. Během infekce ale dochází k sekreci IL-1 β , což je znakem pyroptózy. Infekce buněk kmenem LVS s mutantními geny z FPI má jiný cytopatický efekt než infekce nemutantního kmene LVS. Pro modulaci spouštění drah, které vedou k buněčné smrti, jsou potřebné geny z FPI - *pdpC*, *iglC*, *iglI*, a *iglG*. *Francisella tularensis* LVS má cytopatický efekt na napadené buňky, kdy během 12h dochází k produkci superoxidů v mitochondriích, po 24h už jsou patrné známky poškození mitochondrií, je aktivovaná kaspáza-9 a kaspáza-3, dochází k expresi fosfatidylserinu, zformování nukleozomu a rozpuštění membrány. Delece \DeltaiglI a \DeltaiglC nemají cytopatický efekt na buňku, a to i přes to, že mutanta s delecí \DeltaiglI se množí v cytosolu. U mutantů s delecí \DeltaiglG dochází k pomnožení, ale delece vyvolává pouze malý cytopatický efekt během 24h, po 48h je již cytopatický efekt vyšší, ale stále nedosahuje hodnot WT. U mutantů s delecí $\Delta pdpC$ nedochází k žádnému pomnožení, ale cytopatické projevy se se zpožděním podobají těm, které způsobuje infekce kmenem LVS, krom aktivace kaspázy-9 (LINDGREN et al., 2013).

U krátce žijících (doba života <24h) buněk neutrofilů prodlužuje *Francisella* jejich životnost tak, že oddaluje spuštění apoptózy. K oddálení dochází vlivem poškození vnější i vnitřní signalizace, která by vedla k apoptóze. *Francisella tularensis* LVS snižuje aktivaci kaspázy-8 a

kaspázy-9 a tím oddaluje aktivaci kaspázy-3, která by spouštěla apoptózu. Infikovaná buňka je také neschopná provést apoptózu, která by byla spuštěna signalizací Fas (SCHWARTZ et al., 2012).

4.3. Neadaptivní imunita

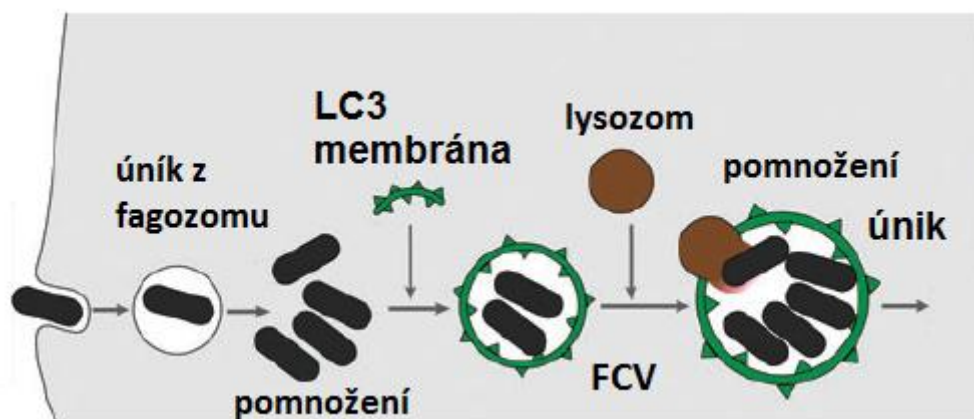
Neadaptivní imunita je evolučně starší než adaptivní imunita. Neadaptivní imunita je založena na molekulách a buňkách, které jsou již v organismu připraveny předem a jsou účinné proti mnoha různým patogenům tím, že reagují na strukturní nebo funkční rysy, které jsou jim společné. Nespecifická imunita je tvořena humorální a buněčnou složkou. Do buněčné složky neadaptivní imunity patří fagocytující buňky a cytotoxické buňky. Humorální složku nespecifické imunity tvoří komplementový systém, interferony a jiné sérové proteiny. Nespecifické složky imunity reagují na přítomnost patogenů rychle, řádově v minutách (Hořejší, 2013).

4.3.1. Autofagie

Autofagie je vnitrobuněčný degradační proces, jež je důležitou součástí obrany buňky proti vnitrobuněčným patogenům, který doručuje cytoplazmatický materiál lysozomům k degradaci. Cytoplazmatický obsah je obklopen izolovanou membránou, která se prodlužuje a vytváří dvoumembránovou vakuolu (autofagozom). Autofagozom fúzuje s lysozomem za vzniku autolysozomu, kde dochází k degradaci obklopeného materiálu. Autofagie funguje jako kontrolor kvality cytoplazmatického obsahu, který likviduje agregáty, poškozené organely a vnitrobuněčné mikroorganismy (LEVINE et al., 2011; MIZUSHIMA a KOMATSU, 2011).

Po úniku bakterie z fagozomu do cytosolu probíhá bakteriální množení v časovém rozmezí 4-20h po infekci. Během rychlého pomnožení dochází k tisíci násobnému zmnožení bakterií. *Francisella tularensis* není schopna syntetizovat všechny aminokyseliny de novo, a proto musí získávat potřebné aminokyseliny z hostitelské buňky. Dostatečné množství stavebního materiálu si *Francisella* zajišťuje tak, že donutí buňku spustit autofagii buněčných organel (STEELE et al., 2013). U makrofágů aktivovaných IFN- γ dochází k snížení množství volného tryptofanu v cytosolu. Tato sekvestrace tryptofanu nevede *Francisella tularensis*, protože má geny *trpAB*, které kódují enzymy účastnící se syntézy tryptofanu (CHU et al., 2011).

Pomnožené bakterie vstupují do velkých vakuol FCV (*Francisella* Containg Vacuole), které jsou LAMP-1 (Lysosome Associated Membrane Protein) pozitivní v případě myších makrofágů BMMs, ale už nikoliv u lidských makrofágů MDMs (CHECROUN et al., 2006; EDWARDS et al., 2010; Akimana et al., 2010). FCV jsou membránové struktury, které mají na svém povrchu proteiny LC3, které jsou charakteristické pro autofagii. Ačkoliv autofagozomy fúzí s lysozomy, nedochází k degradaci *Francisella* (CHECROUN et al., 2006).



Obr. 10: Autofagie *Francisella*

Pohlčená *Francisella tularensis* uniká z fagozomu do cytosolu, kde dochází k jejímu pomnožení. Bakterie následně vstupují autofagií do FCV, které fúzí s lysozomy. Převzato z OGAWA et al. (2011).

Po vstupu do buňky se *Francisella* nachází ve fagozomu, ze kterého uniká do cytosolu a pak vstupuje do FCV, ze kterých je dále schopna unikat zpátky do cytosolu (Obr. 10). *Francisella* defektní v *dip* (Deficient in Intracellular Proliferation) genech je neschopna cytosolického pomnožení a autofagií se dostává do autofagozomů. U kmene *SchuS4* s $\Delta dipA$ nedochází k cytosolickému pomnožení, ale není jasné, zda dochází k usmrcení bakterií vlivem fyziologického defektu nebo k odstranění pomocí autofagie (CHONG et al., 2012).

4.3.2. Inflamazom

Inflamazom je multiproteinový komplex, který je součástí neadaptivní imunity, a nachází se v cytosolu, kde rozeznává cizorodé částice pomocí receptorů pro PAMPs a DAMPs. Inflamazom je složený z NOD-like receptoru případně jiného receptoru a adaptorového proteinu (ASC), který váže prokaspázu-1. Inflamazom aktivuje kaspázu-1 a translokaci NF- κ B do jádra (HORNUNG et al., 2009). Kaspáza-1 je cysteinová proteáza, která štěpí prozánětlivé prekurzory pro-IL-1 β nebo pro-IL-18 (ABDUL-SATER et al., 2009). IL-1 β a IL-18 jsou

prozánětlivé cytokiny, které jsou klíčové v obraně proti infekci tím, že aktivují adaptivní imunitní odpověď Th1 a Th17 (NETEA et al., 2010). Transkripční faktor NF- κ B má klíčovou roli v regulaci apoptózy, protože spouští expresi řady anti-apoptických genů (BURSTEIN et al., 2003). Za normálních podmínek se NF- κ B vyskytuje v cytoplasmě, ale *Francisella* indukuje jeho časnou translokaci do jádra, což vede k expresi anti-apoptických genů. Dále *Francisella* aktivuje v makrofázích kaspázu-1 i kaspázu-3, ale nedochází k apoptóze (SANTIC et al., 2010). Aktivace inflamazomu vede k programované buněčné smrti pyroptózou (BERGSBAKEN et al., 2009).

Makrofágy infikované *Francisella tularensis* podléhají buněčné smrti pyroptózou, při které dochází k vylití prozánětlivých cytokinů IL-1 β a IL-18 z buňky do mezibuněčného prostoru. Buněčná odpověď na množící se bakterie v cytosolu je založena na rozeznání dsDNA, která je uvolněna z lyzovaných bakterií. Tato dsDNA je rozeznána cytosolickým senzorem AIM2 (Absent In Melanoma 2). Na myším modelu defektním v AIM2 při infekci *Francisella tularensis* nedochází k sekreci IL-1 β , aktivaci kaspázy-1 ani buňky nepodléhají buněčné smrti (FERNANDES-ALNEMRI et al., 2010; JONES et al., 2010). AIM2 po navázání dsDNA na C-terminální doménu oligomerizuje a interaguje s adaptorovým proteinem ASC na jeho N-terminální pyrinové doméně. Touto interakce dochází k vytvoření ASC pyroptozómu/AIM2 inflamazomu. ASC pyroptozóm indukuje pyroptózu tím, že aktivuje kaspázy-1, -3 a -8 (FERNANDES-ALNEMRI et al., 2010). U makrofágů s defektní kaspázou-1 způsobí *Francisella* buněčnou smrt apoptózou. Buňka podléhá apoptóze, protože komplex AIM2/ASC aktivuje kaspázu-8, která spouští dráhu vedoucí k aktivaci kaspázy-3. Oproti tomu při infekci normálních makrofágů dochází k buněčné smrti pyroptózou (PIERINI et al., 2012).

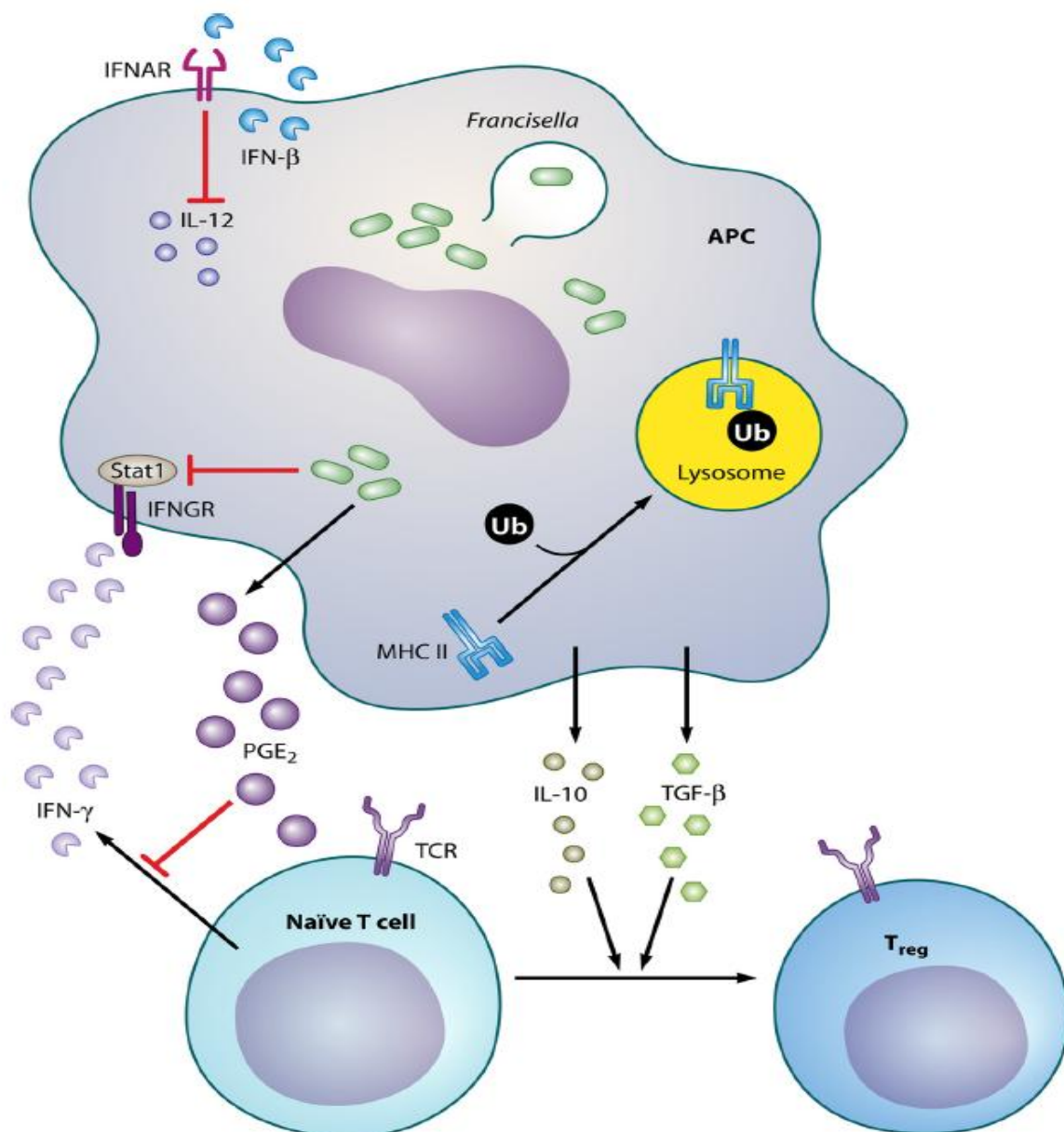
4.4. Adaptivní imunita

Antigenně specifické mechanismy reagují na každou cizorodou strukturu prostřednictvím vysoce specifických molekul (protilátky, antigenně specifické receptory T lymfocytů). Protilátky představují humorální složku a T lymfocyty buněčnou složku adaptivní imunity. Tyto mechanismy jsou spouštěny až po setkání s antigenem, který je prezentovaný v MHC II (Major Histocompatibility Complex II) komplexu, a pro jejich iniciaci je nezbytná aktivita složek neadaptivní imunitní odpovědi, jako jsou antigen prezentující buňky (APC). APC prezentují na svém povrchu v MHC II komplexech pozřené a zpracované antigeny. Interakce T buněk a APC

vede k sekreci IFN- γ z T lymfocytů. IFN- γ aktivuje makrofágy, jež jsou poté schopny snáze potlačit bakteriální infekci. K úplnému rozvoji specifické imunitní reakce je zapotřebí několika dní až týdnů (Hořejší, 2013).

4.4.1. Modifikace adaptivní imunity

Intracelulární patogenní bakterie využívají celou řadu mechanismů, kterými se snaží vyhnout imunitní odpovědi. Některé unikají z fagozomu makrofágů či zabraňují fúzi fagozomu s lysozomy. Další snižují expresi MHC I a MHC II na povrchu buněk nebo případně mění prozánětlivou odpověď na protizánětlivou. *Francisella tularensis* má ve své strategii připraveno mnoho mechanismů (Obr. 11), jak upravit prostředí uvnitř napadené buňky tak, aby si zajistila vhodné podmínky pro své pomnožení. Mezi tyto mechanismy patří omezení aktivace adaptivní imunity, jež by vedla k odstraňování infikovaných buněk a v konečném důsledku i k úplnému odstranění patogenních bakterií z hostitelského organismu.



Obr. 11: Jak *Francisella* modifikuje buňku

Francisella pozměňuje adaptivní imunitní odpověď tím, že v infikovaných antigen prezentujících buňkách (APC) zeslabuje produkci prozánětlivých cytokinů a indukuje produkci PGE_2 , který inhibuje produkci $\text{IFN-}\gamma$ v T lymfocytech. $\text{IFN-}\gamma$ je schopen aktivovat makrofágy do stavu, ve kterém jsou schopny odstranit bakteriální infekci, a proto *Francisella* také blokuje signalizaci $\text{IFN-}\gamma$ tak, že inhibuje fosforylaci transkripčního faktoru STAT1, jež by byl fosforylován pro signalizaci $\text{IFN-}\gamma$. *Francisella* indukuje produkci $\text{IFN-}\beta$, který inhibuje produkci prozánětlivého IL-12. *Francisella* také způsobuje degradaci MHC II komplexů, které by mohly vystavovat na povrchu antigeny z *Francisella* a aktivovat tak T lymfocyty. Dále pak ještě *Francisella* indukuje produkci protizánětlivých cytokinů $\text{TGF-}\beta$ a IL-10, které přispívají k tvorbě regulačních T buněk, jež tlumí adaptivní imunitní odpověď. Převzato z Jones et al. (2012).

Při experimentech, kdy byly aktivované makrofágy infikovány *Francisella tularensis* kmene *SchuS4*, docházelo k omezení bakteriálního růstu v cytosolu. Avšak při infekci aktivovaných makrofágů kmenem *LVS* docházelo k úplnému zabránění bakteriálního růstu v cytosolu,

protože kmen *LVS* nedokázal uniknout z fagozomu do cytosolu (EDWARDS et al., 2010). *Francisella tularensis* využívá mechanismy, kterými se snaží omezit expresi genů, které jsou indukovány pomocí IFN- γ , resp. transkripčním faktorem STAT1. K omezení exprese těchto genů není potřebný únik bakterie z fagozomu ani cytosolické pomnožení. Toto omezení exprese má na svědomí tepelně stabilní bakteriální faktor, který je konstitutivně produkován u *Francisella* (PARSA et al., 2008). Kmen *Francisella tularensis* *SchuS4* blokuje signalizaci vedoucí k produkci cytokinů tak, že zabráňuje fosforylaci proteinu Akt, degradaci I κ B α a translokaci NF- κ B do jádra. Fosforylaci proteinu Akt zabráňuje jeho antagonist PTEN, který vykazuje vyšší hladinu po infekci *Francisella*. Peroxid vodíku inhibuje PTEN a proto si *Francisella tularensis* nese gen *katG* pro enzym s katalázovou i peroxidázovou aktivitou. Může tak odbourávat peroxid vodíku, jenž je produkován v rámci imunitní odpovědi buňky na infekci bakterií (MELILLO et al., 2010). *Francisella tularensis* kmene *SchuS4* dále inhibuje pomocí IFN- β produkci prozánětlivého IL-12p40 v primárních liniích lidských dendritických buněk. Pro iniciaci produkce IFN- β musí bakterie uniknout z fagozomu do cytosolu. Kmen *LVS* není na rozdíl od kmene *SchuS4* schopen inhibovat produkci prozánětlivých cytokinů (BAULER et al., 2011).

Při infekci *Francisella* ovlivňuje v napadených buňkách produkci cytokinů. *Francisella tularensis* *novicida* při infekci lidských monocytů vyvolává zvýšení produkce podjednotky p19 IL-23 a p40 IL-12. IL-23, heterodimer p19 a p40, jakožto důležitý cytokin neadaptivní imunity je sekretován z buňky a indukuje produkci IFN- γ u NK buněk. Zvýšení produkce p19 a p40 je závislé na PI3K a aktivitě NF- κ B. Kmen *SchuS4* při infekci monocytů taktéž indukuje produkci a sekreci IL-23 (BUTCHAR et al., 2007). Při infekci makrofágů bakterií *Francisella tularensis* dochází k indukci sekrece prostaglandinu E_2 (PGE $_2$). PGE $_2$ modifikuje T lymfocyty tak, že produkují méně IFN- γ a IL-2, ale také více IL-5. IL-5 je protizánětlivý cytokin, který je produkován během Th2 odpovědi, která je namířena proti extracelulárním parazitům a tedy intracelulární *Francisella* neublíží (WOOLARD et al., 2007; Hořejší, 2013). PGE $_2$ působí i v IFN- γ aktivovaných makrofázích, kde indukuje produkci hostitelského faktoru, který je rozpustný, větší než 10 kDa a je rezistentní k proteázám. Tento faktor indukuje produkci IL-10 v makrofázích a spolu se pak podílejí na degradaci MHC II. K degradaci MHC II dochází pomocí ubiquitinilace a následné degradace v lysozomu. Sekrece PGE $_2$ umožní degradaci MHC II i u okolních antigen prezentujících buněk, které pak nejsou schopné prezentovat na svém

povrchu antigeny a tím aktivovat T lymfocyty, které by mohly začít produkovat IFN- γ a posílit tak schopnost makrofágů odstraňovat patogeny (WILSON et al., 2009, HUNT et al., 2012). Pro *Francisella* je tedy výhodné, že pokud nedokáží přežít všechny bakterie v aktivovaných makrofázích, tak alespoň nedochází k prezentaci jejich antigenů na povrchu APC, čímž je alespoň omezována aktivace adaptivní imunitní odpovědi.

5. Závěr

Intracelulární život *Francisella tularensis* zahrnuje několik fází a každá z nich je kritická pro úspěšné přežití bakterie. Ještě před tím než *Francisella* vstoupí do buňky, už je rozhodnuto podle její opsonizace jak bude probíhat její cesta skrze buněčné organely. V první fázi intracelulárního života *Francisella* musí čelit prostředí fagozomu do kterého se dostává během svého vstupu do buňky. Ve fagozomu sice dokáže zablokovat hostitelské obranné mechanismy, jako je tvorba kyslíkových radikálů, ale není zde schopna se pomnožit, a proto musí uniknout do cytosolu. Pro únik z fagozomu je důležitý sekreční systém typu VI, který je spolu s dalšími geny nutnými pro únik kódován na ostrovu patogenity. V současné době neznáme přesný mechanismus, jakým dochází k rozrušení membrány fagozomu, ale víme, že k tomu jsou potřebné geny z ostrova patogenity, ale i další. Po úniku z fagozomu dochází k pomnožení *Francisella* v cytosolu. Na pomnožené bakterie ale i zde číhají obranné mechanismy imunitního systému, jako jsou senzory rozeznávající dsDNA, která se uvolňuje z lyzovaných bakterií, či komplexy proteinů, které spouštějí autofagii bakterií. Oba tyto mechanismy mají za cíl odstranit bakterie z buňky. *Francisella* je ale schopna narušit autofagii tak, že přežívá i v autofagozomech, které ji měly odstranit. Senzory rozeznávající dsDNA z lyzovaných bakterií umožní vytvoření komplexu inflamazomu, který zahájí kaskádu, která končí buněčnou smrtí napadené buňky. *Francisella* je ale schopna prodloužit dobu života napadené buňky tak, že poškozuje signalizaci v kaskádě, která končí buněčnou smrtí hostitelské buňky, a tím si prodloužit dobu po kterou se může v buňce množit. Smrt hostitelské buňky pak umožní bakterii se rozšířit do okolních buněk. Dále také *Francisella* poškozuje schopnost buněk prezentovat antigeny v MHC II komplexech na jejich povrchu, což spolu s tím, že také indukuje produkci a sekreci faktorů, které tlumí adaptivní imunitní odpověď, činí *Francisella tularensis* úspěšným patogenním organismem.

Seznam použité literatury

ABDUL-SATER, A.A., SAID-SADIER, N., OJCIUS, D.M., YILMAZ, O., a KELLY, K.A. (2009). Inflammasomes bridge signaling between pathogen identification and the immune response. *Drugs Today*, 45, 105–112.

AKIMANA, Christine, Souhaila AL-KHODOR, Yousef ABU KWAİK a Ramy K. AZIZ (2010). Host Factors Required for Modulation of Phagosome Biogenesis and Proliferation of *Francisella tularensis* within the Cytosol. *PLoS ONE*, 5 (6), e11025-.

ALBERTS, Bruce. *Molecular biology of the cell*. 4th ed. New York: Garland Science, 2002. ISBN 0815340729.

AL-KHODOR, Souhaila a Yousef ABU KWAİK (2010). Triggering Ras signalling by intracellular *Francisella tularensis* through recruitment of PKC α and β I to the SOS2/GrB2 complex is essential for bacterial proliferation in the cytosol. *Cellular Microbiology*, 12 (11), 1604-1621.

BALAGOPAL, A., A. S. MACFARLANE, N. MOHAPATRA, S. SONI, J. S. GUNN a L. S. SCHLESINGER (2006). Characterization of the Receptor-Ligand Pathways Important for Entry and Survival of *Francisella tularensis* in Human Macrophages. *Infection and Immunity*, 74 (9), 5114-5125.

BARKER JR, JR, A CHONG, TD WEHRLY, JJ YU, SA RODRIGUEZ, J LIU, J CELLI, BP ARULANANDAM a KE KLOSE (2009). The *Francisella tularensis* pathogenicity island encodes a secretion system that is required for phagosome escape and virulence. *Molecular Microbiology*, 74 (6).

BAULER, T. J., J. C. CHASE a C. M. BOSIO (2011). IFN- Mediates Suppression of IL-12p40 in Human Dendritic Cells following Infection with Virulent *Francisella tularensis*. *The Journal of Immunology*, 187 (4), 1845-1855.

BENEŠ, Jiří. *Infekční lékařství*. 1. vyd. Praha: Galén, 2009, s. 256-259. ISBN 9788072626441.

BERGSBAKEN, Tessa, Susan L. FINK a Brad T. COOKSON (2009). Pyroptosis: host cell death and inflammation. *Nature Reviews Microbiology*, 7 (2), 99-109.

BROEKHUIJSEN, M., P. LARSSON, A. JOHANSSON, M. BYSTROM, U. ERIKSSON, E. LARSSON, R. G. PRIOR, A. SJOSTEDT, R. W. TITBALL a M. FORSMAN (2003). Genome-Wide DNA Microarray Analysis of *Francisella tularensis* Strains Demonstrates Extensive Genetic Conservation within the Species but Identifies Regions That Are Unique to the Highly Virulent *F. tularensis* subsp. *tularensis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 41 (7), 2924-2931.

BROMS, J. E., M. LAVANDER, L. MEYER a A. SJOSTEDT (2011). IgI_G and IgI_H of the *Francisella* Pathogenicity Island Are Important Virulence Determinants of *Francisella tularensis* LVS. *Infection and Immunity*, 79 (9), 3683-3696.

BRÖMS, Jeanette E., Anders SJÖSTEDT a Moa LAVANDER (2010). The Role of the *Francisella* *Tularensis* Pathogenicity Island in Type VI Secretion, Intracellular Survival, and Modulation of Host Cell Signaling. *Frontiers in Microbiology*, 1.

BRÖMS, Jeanette E., Lena MEYER, Kun SUN, Moa LAVANDER, Anders SJÖSTEDT a Yung-Fu CHANG (2012). Unique Substrates Secreted by the Type VI Secretion System of *Francisella tularensis* during Intramacrophage Infection. *PLoS ONE*, 7 (11), e50473-.

BURSTEIN, Ezra a Colin S DUCKETT (2003). Dying for NF- κ B? Control of cell death by transcriptional regulation of the apoptotic machinery. *Current Opinion in Cell Biology*, 15 (6), 732-737.

BUTCHAR, J. P., M. V. S. RAJARAM, L. P. GANESAN, K. V. L. PARSA, C. D. CLAY, L. S. SCHLESINGER a S. TRIDANDAPANI (2007). *Francisella tularensis* Induces IL-23 Production in Human Monocytes. *The Journal of Immunology*, 178 (7), 4445-4454.

BUTCHAR, Jonathan P., Thomas J. CREMER, Corey D. CLAY, Mikhail A. GAVRILIN, Mark D. WEWERS, Clay B. MARSH, Larry S. SCHLESINGER, Susheela TRIDANDAPANI a Mauricio Martins RODRIGUES (2008). Microarray Analysis of Human Monocytes Infected with *Francisella tularensis* Identifies New Targets of Host Response Subversion. *PLoS ONE*, 3 (8), e2924-.

CLEMENS, D. L., B.-Y. LEE a M. A. HORWITZ (2005). *Francisella tularensis* Enters Macrophages via a Novel Process Involving Pseudopod Loops. *Infection and Immunity*, 73 (9), 5892-5902.

DE BRUIN, O. M., B. N. DUPLANTIS, J. S. LUDU, R. F. HARE, E. B. NIX, C. L. SCHMERK, C. S. ROBB, A. B. BORASTON, K. HUEFFER a F. E. NANO (2011). The biochemical properties of the Francisella pathogenicity island (FPI)-encoded proteins IgIA, IgIB, IgIC, PdpB and DotU suggest roles in type VI secretion. *Microbiology*, 157 (12), 3483-3491.

EDWARDS, J. A., D. ROCKX-BROUWER, V. NAIR a J. CELLI (2010). Restricted cytosolic growth of Francisella tularensis subsp. tularensis by IFN- activation of macrophages. *Microbiology*, 156 (2), 327-339.

ELLIS, J., P. C. F. OYSTON, M. GREEN a R. W. TITBALL (2002). Tularemia. *Clinical Microbiology Reviews*, 15 (4), 631-646.

FERNANDES-ALNEMRI, Teresa, Je-Wook YU, Christine JULIANA, Leobaldo SOLORZANO, Seokwon KANG, Jianghong WU, Pinaki DATTA, Margaret MCCORMICK, Lan HUANG, Erin MCDERMOTT, Laurence EISENLOHR, Carlisle P LANDEL a Emad S ALNEMRI (2010). The AIM2 inflammasome is critical for innate immunity to Francisella tularensis. *Nature Immunology*, 11 (5), 385-393.

FLANNAGAN, Ronald S., Gabriela COSÍO a Sergio GRINSTEIN (2009). Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies. *Nature Reviews Microbiology*, 7 (5), 355-366.

FORSMAN, M., G. SANDSTROM a A. SJOSTEDT (1994). Analysis of 16S Ribosomal DNA Sequences of Francisella Strains and Utilization for Determination of the Phylogeny of the Genus and for Identification of Strains by PCR. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44 (1), 38-46.

GEIER, H. a J. CELLI (2011). Phagocytic Receptors Dictate Phagosomal Escape and Intracellular Proliferation of Francisella tularensis. *Infection and Immunity*, 79 (6), 2204-2214.

GEKARA, N.O. a S. WEISS (2004). Lipid rafts clustering and signalling by listeriolysin O. *Biochemical Society Transactions*, 32 (5), 712-714.

GOLOVLIOV, I., V. BARANOV, Z. KROCOVA, H. KOVAROVA a A. SJOSTEDT (2003). An Attenuated Strain of the Facultative Intracellular Bacterium *Francisella tularensis* Can Escape the Phagosome of Monocytic Cells. *Infection and Immunity*, 71 (10), 5940-5950.

HENRY, T., A. BROTCHE, D. S. WEISS, L. J. THOMPSON a D. M. MONACK (2007). Type I interferon signaling is required for activation of the inflammasome during *Francisella* infection. *Journal of Experimental Medicine*, 204 (5), 987-994.

HORNUNG, Veit, Andrea ABLASSER, Marie CHARREL-DENNIS, Franz BAUERNFEIND, Gabor HORVATH, Daniel. R. CAFFREY, Eicke LATZ a Katherine A. FITZGERALD (2009). AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC. *Nature*, 458 (7237), 514-518.

HORZEMPA, J., D. M. O'DEE, D. B. STOLZ, J. M. FRANKS, D. CLAY a G. J. NAU (2011). Invasion of Erythrocytes by *Francisella tularensis*. *Journal of Infectious Diseases*, 204 (1), 51-59.

HOŘEJŠÍ, Václav. *Základy imunologie*. 5. vyd. Praha: Triton, 2013, 330. ISBN 978-807-3877-132.

HUNT, Danielle, Justin E. WILSON, Karis A. WEIH, Satoshi ISHIDO, Jonathan A. HARTON, Paul A. ROCHE, James R. DRAKE a Susan KOVATS (2012). *Francisella tularensis* Elicits IL-10 via a PGE2-Inducible Factor, to Drive Macrophage MARCH1 Expression and Class II Down-Regulation. *PLoS ONE*, 7 (5), e37330-.

CHECROUN, C., T. D. WEHRLY, E. R. FISCHER, S. F. HAYES a J. CELLI (2006). Autophagy-mediated reentry of *Francisella tularensis* into the endocytic compartment after cytoplasmic replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103 (39), 14578-14583.

CHU, P., A. R. RODRIGUEZ, B. P. ARULANANDAM a K. E. KLOSE (2011). Tryptophan Prototrophy Contributes to *Francisella tularensis* Evasion of Gamma Interferon-Mediated Host Defense. *Infection and Immunity*, 79 (6), 2356-2361.

CHONG, Audrey, Tara D. WEHRLY, Robert CHILD, Bryan HANSEN, Seungmin HWANG, Herbert W. VIRGIN a Jean CELLI (2012). Cytosolic clearance of replication-deficient mutants reveals *Francisella tularensis* interactions with the autophagic pathway. *Autophagy*, 8 (9), 1342-1356.

JONES, J. W., N. KAYAGAKI, P. BROZ, T. HENRY, K. NEWTON, K. O'ROURKE, S. CHAN, J. DONG, Y. QU, M. ROOSE-GIRMA, V. M. DIXIT a D. M. MONACK (2010). Absent in melanoma 2 is required for innate immune recognition of *Francisella tularensis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107 (21), 9771-9776.

JONES, C. L., B. A. NAPIER, T. R. SAMPSON, A. C. LLEWELLYN, M. R. SCHROEDER a D. S. WEISS (2012). Subversion of Host Recognition and Defense Systems by *Francisella* spp. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 76 (2), 383-404.

KEIM, P., A. JOHANSSON a D. M. WAGNER (2007). Molecular Epidemiology, Evolution, and Ecology of *Francisella*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1105 (1), 30-66.

KENNETH, Ryan J. *Sherrie medical microbiology*. 5th ed. New York: McGraw Hill Medical, 2010, s. 488-490. ISBN 9780071604024.

KUOLEE, Rhonda, Greg HARRIS, J. Wayne CONLAN a Wangxue CHEN (2011). Role of neutrophils and NADPH phagocyte oxidase in host defense against respiratory infection with virulent *Francisella tularensis* in mice. *Microbes and Infection*, 13 (5), 447-456.

LAMKANFI, Mohamed a Vishva M. DIXIT (2010). Manipulation of Host Cell Death Pathways during Microbial Infections. *Cell Host*, 8 (1), 44-54.

LAURIANO, C. M., J. R. BARKER, S.-S. YOON, F. E. NANO, B. P. ARULANANDAM, D. J. HASSETT a K. E. KLOSE (2004). MglA regulates transcription of virulence factors necessary for *Francisella tularensis* intraamoebae and intramacrophage survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101 (12), 4246-4249.

LAW, H. T., Ann En-Ju LIN, Youra KIM, Brian QUACH, Francis E. NANO a Julian Andrew GUTTMAN (2011). *Francisella tularensis* Uses Cholesterol and Clathrin-Based Endocytic Mechanisms to Invade Hepatocytes. *Scientific Reports*, 1,192.

LEVINE, Beth, Noboru MIZUSHIMA a Herbert W. VIRGIN (2011). Autophagy in immunity and inflammation. *Nature*, 469 (7330), 323-335.

LINDGREN, H. (2004). Factors affecting the escape of *Francisella tularensis* from the phagolysosome. *Journal of Medical Microbiology*, 53 (10), 953-958.

LINDGREN, M., K. ENESLATT, J. E. BROMS a A. SJOSTEDT (2013). Importance of PdpC, IgIC, IgII, and IgIG for Modulation of a Host Cell Death Pathway Induced by Francisella tularensis. *Infection and Immunity*, 81 (6), 2076-2084.

LUDU, J. S., O. M. DE BRUIN, B. N. DUPLANTIS, C. L. SCHMERK, A. Y. CHOU, K. L. ELKINS a F. E. NANO (2008). The Francisella Pathogenicity Island Protein PdpD Is Required for Full Virulence and Associates with Homologues of the Type VI Secretion System. *Journal of Bacteriology*, 190 (13), 4584-4595.

MCCAFFREY, R. L. a L.-A. H. ALLEN (2006). Francisella tularensis LVS evades killing by human neutrophils via inhibition of the respiratory burst and phagosome escape. *Journal of Leukocyte Biology*, 80 (6), 1224-1230.

MCCAFFREY, R. L., J. T. SCHWARTZ, S. R. LINDEMANN, J. G. MORELAND, B. W. BUCHAN, B. D. JONES a L.-A. H. ALLEN (2010). Multiple mechanisms of NADPH oxidase inhibition by type A and type B Francisella tularensis. *Journal of Leukocyte Biology*, 88 (4), 791-805.

MELILLO, A. A., C. S. BAKSHI a J. A. MELENDEZ (2010). Francisella tularensis Antioxidants Harness Reactive Oxygen Species to Restrict Macrophage Signaling and Cytokine Production. *Journal of Biological Chemistry*, 285 (36), 27553-27560.

MIZUSHIMA, Noboru a Masaaki KOMATSU (2011). Autophagy: Renovation of Cells and Tissues. *Cell*, 147 (4), 728-741.

MOHAPATRA, N. P., S. SONI, M. V. S. RAJARAM, P. M. C. DANG, T. J. REILLY, J. EL-BENNA, C. D. CLAY, L. S. SCHLESINGER a J. S. GUNN (2010). Francisella Acid Phosphatases Inactivate the NADPH Oxidase in Human Phagocytes. *The Journal of Immunology*, 184 (9), 5141-5150.

NANO, F. E., N. ZHANG, S. C. COWLEY, K. E. KLOSE, K. K. M. CHEUNG, M. J. ROBERTS, J. S. LUDU, G. W. LETENDRE, A. I. MEIEROVICS, G. STEPHENS a K. L. ELKINS (2004). A Francisella tularensis Pathogenicity Island Required for Intramacrophage Growth. *Journal of Bacteriology*, 186 (19), 6430-6436.

NAUSEEF, William M. (2004). Assembly of the phagocyte NADPH oxidase. *Histochemistry and Cell Biology*, 122 (4), 277-291.

NETEA, Mihai G., Anna SIMON, Frank VAN DE VEERDONK, Bart-Jan KULLBERG, Jos W. M. VAN DER MEER, Leo A. B. JOOSTEN a Marianne MANCHESTER (2010). IL-1 β Processing in Host Defense: Beyond the Inflammasomes. *PLoS Pathogens*, 6 (2), e1000661-.

OGAWA, Michinaga, Hitomi MIMURO, Yuko YOSHIKAWA, Hiroshi ASHIDA a Chihiro SASAKAWA (2011). Manipulation of autophagy by bacteria for their own benefit. *Microbiology and Immunology*, 55 (7), 459-471.

PARSA, Kishore V.L., Jonathan P. BUTCHAR, Murugesan V.S. RAJARAM, Thomas J. CREMER, John S. GUNN, Larry S. SCHLESINGER a Susheela TRIDANDAPANI (2008). Francisella gains a survival advantage within mononuclear phagocytes by suppressing the host IFN γ response. *Molecular Immunology*, 45 (12), 3428-3437.

PIERINI, R., C. JURUJ, M. PERRET, C. L. JONES, P. MANGEOT, D. S. WEISS a T. HENRY (2012). AIM2/ASC triggers caspase-8-dependent apoptosis in Francisella-infected caspase-1-deficient macrophages. *Cell Death and Differentiation*, 19 (10), 1709-1721.

RAJARAM, Murugesan V. S., Jonathan P. BUTCHAR, Kishore V. L. PARSA, Thomas J. CREMER, Amal AMER, Larry S. SCHLESINGER, Susheela TRIDANDAPANI a Christopher E. RUDD (2009). Akt and SHIP Modulate Francisella Escape from the Phagosome and Induction of the Fas-Mediated Death Pathway. *PLoS ONE*, 4 (11), 7919-.

RAY, Katrina, Benoit MARTEYN, Philippe J. SANSONETTI a Christoph M. TANG (2009). Life on the inside: the intracellular lifestyle of cytosolic bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 7 (5), 333-340.

SANTIC, M., R. ASARE, I. SKROBONJA, S. JONES a Y. ABU KWAIK (2008). Acquisition of the Vacuolar ATPase Proton Pump and Phagosome Acidification Are Essential for Escape of Francisella tularensis into the Macrophage Cytosol. *Infection and Immunity*, 76 (6), 2671-2677.

SANTIC, Marina, Gordana PAVOKOVIC, Snake JONES, Rexford ASARE a Yousef Abu KWAIK (2010). Regulation of apoptosis and anti-apoptosis signalling by Francisella tularensis. *Microbes and Infection*, 12 (2), 126-134.

SANTIC, Marina, Maelle MOLMERET a Yousef ABU KWAIK (2005). Modulation of biogenesis of the *Francisella tularensis* subsp. *novicida*-containing phagosome in quiescent human macrophages and its maturation into a phagolysosome upon activation by IFN- γ . *Cellular Microbiology*, 7 (7), 957-967.

SANTIC, Marina, Maelle MOLMERET, Jeffrey R. BARKER, Karl E. KLOSE, Andrea DEKANIC, Miljenko DORIC a Yousef ABU KWAIK (2007). A *Francisella tularensis* pathogenicity island protein essential for bacterial proliferation within the host cell cytosol. *Cellular Microbiology*, 9 (10), 2391-2403.

SANTIC, Marina, Maelle MOLMERET, Karl E. KLOSE, Snake JONES a Yousef Abu KWAIK (2005). The *Francisella tularensis* pathogenicity island protein IgIC and its regulator MglA are essential for modulating phagosome biogenesis and subsequent bacterial escape into the cytoplasm. *Cellular Microbiology*, 7 (7), 969-979.

SEVEAU, S. (2004). Role of lipid rafts in E-cadherin- and HGF-R/Met-mediated entry of *Listeria monocytogenes* into host cells. *The Journal of Cell Biology*, 166 (5), 743-753.

SCHRODER, K. (2003). Interferon- : an overview of signals, mechanisms and functions. *Journal of Leukocyte Biology*, 75 (2), 163-189.

SCHWARTZ, J. T., J. H. BARKER, J. KAUFMAN, D. C. FAYRAM, J. M. MCCracken a L.-A. H. ALLEN (2012). *Francisella tularensis* Inhibits the Intrinsic and Extrinsic Pathways To Delay Constitutive Apoptosis and Prolong Human Neutrophil Lifespan. *The Journal of Immunology*, 188 (7), 3351-3363.

STARK, George R., Ian M. KERR, Bryan R. G. WILLIAMS, Robert H. SILVERMAN a Robert D. SCHREIBER (1998). HOW CELLS RESPOND TO INTERFERONS. *Annual Review of Biochemistry*, 67 (1), 227-264.

STEELE, Shaun, Jason BRUNTON, Benjamin ZIEHR, Sharon TAFT-BENZ, Nathaniel MOORMAN, Thomas KAWULA a Pascale COSSART (2013). *Francisella tularensis* Harvests Nutrients Derived via ATG5-Independent Autophagy to Support Intracellular Growth. *PLoS Pathogens*, 9 (8), e1003562-.

TAMILSELVAM, B. a S. DAEFLER (2008). Francisella Targets Cholesterol-Rich Host Cell Membrane Domains for Entry into Macrophages. *The Journal of Immunology*, 180 (12), 8262-8271.

UNDERHILL, David M. a Adrian OZINSKY (2002). PHAGOCYTOSIS OF MICROBES: Complexity in Action. *Annual Review of Immunology*, 20 (1), 825-852.

WILSON, J. E., B. KATKERE a J. R. DRAKE. (2009). Francisella tularensis Induces Ubiquitin-Dependent Major Histocompatibility Complex Class II Degradation in Activated Macrophages. *Infection and Immunity*, 77 (11), 4953-4965.

WOOLARD, M. D., J. E. WILSON, L. L. HENSLEY, L. A. JANIA, T. H. KAWULA, J. R. DRAKE a J. A. FRELINGER. (2007). Francisella tularensis-Infected Macrophages Release Prostaglandin E2 that Blocks T Cell Proliferation and Promotes a Th2-Like Response. *The Journal of Immunology*, 178 (4), 2065-2074.